



Document d'orientation #05

Tests de génotoxicité

Avril 2021

Étape 7: Approbation du Comité Directeur

TEST DE GENOTOXICITÉ

Approuvé par le Comité Directeur en
mars 2021

Les entreprises qui souhaitent présenter une demande ou un dossier aux fins d'approbation préalable à la mise en marché devraient contacter les instances réglementaires des pays concernés afin de confirmer que ceux-ci acceptent les dispositions du présent document.

La Coopération Internationale pour la Convergence des Exigences Techniques s'appliquant à l'Évaluation des Ingrédients d'Aliments pour Animaux (International Cooperation for Convergence of Technical Requirements for the Assessment of Feed Ingredients – ICCF) a été créée en 2017 dans le but d'établir des documents d'orientation communs proposant des recommandations techniques pour l'évaluation des ingrédients d'aliments pour animaux entrant dans la composition des aliments pour animaux ainsi que de nouveaux usages destinés à des ingrédients d'aliments pour animaux existants.

Le présent document a été élaboré par un groupe d'experts de l'ICCF et a fait l'objet de consultations menées par les parties prenantes, conformément au processus de l'ICCF.

Les membres fondateurs de l'ICCF sont notamment l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA), la Commission Européenne (DG Santé), la Food and Drug Administration des États Unis (FDA) ainsi que l'American Feed Industry Association (AFIA), l'Association de Nutrition Animale du Canada (ANAC), l'EU Association of Specialty Feed Ingredients and their Mixtures (FEFANA) et l'International Feed Industry Federation (IFIF).

Secretariat: c/o IFIF, P.O. Box 1340 – 51657 Wiehl (Germany) – secretariat@iccffeed.org

Table des matières

1. INTRODUCTION	4
1.1 Objet	4
1.2 Considérations initiales	4
1.3 Définitions	5
1.4 Portée.....	7
2. PRINCIPES GÉNÉRAUX.....	7
3. TESTS IN VITRO	8
3.1 Essai de mutation réverse sur des bactéries (Essai d'Ames)	9
3.2 Essai <i>in vitro</i> sur les micronoyaux des cellules de mammifères (MNT <i>in vitro</i>)	10
3.3 Essai d'aberration chromosomique <i>in vitro</i> chez les mammifères (CAT <i>in vitro</i>).....	10
3.4 Modification des tests	11
3.5 Interprétation des tests <i>in vitro</i>	11
4. TESTS IN VIVO.....	12
4.1 Essai de mutations génétiques des cellules somatiques et germinales de rongeurs transgéniques (RTG)	12
4.2 Test des comètes <i>in vivo</i> en conditions alcalines sur cellules de mammifères (test des comètes)	13
4.3 Test <i>in vivo</i> de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères (MNviv).....	14
4.4 Stratégie de sélection des tests <i>in vivo</i>	14
4.5 Interprétation des tests <i>in vivo</i>	17
5. ÉVALUATION DES DONNÉES ET ANALYSE STATISTIQUE.....	18
6. RAPPORT DE DONNÉES	18
7. BIBLIOGRAPHIE.....	19
7.1 Lignes directrices internationales	19
7.2 Documents d'orientation européens	20

7.3 AUTRES.....	20
8. ABBRÉVIATIONS	21

TESTS DE GÉNOTOXICITÉ

1. INTRODUCTION

1.1 Objet

Dans l'évaluation de la sécurité sanitaire¹ des ingrédients d'aliments pour animaux, le potentiel de génotoxicité est un élément clé de la batterie de paramètres de toxicité requis qui doivent être pris en considération. Il est important d'élaborer une approche cohérente sur la façon d'évaluer le potentiel génotoxique des ingrédients d'aliments pour animaux.

Le présent document fournit des orientations aux demandeurs d'évaluation préalable à la mise en marché concernant l'approche à adopter pour caractériser le potentiel génotoxique d'un ingrédient d'aliments pour animaux, conformément à la section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** (Portée). Il a été élaboré par une équipe internationale d'experts, et il tient compte des meilleures pratiques relatives à la caractérisation du danger génotoxique associé à l'utilisation d'un ingrédient d'aliments pour animaux.

Bien que ce document d'orientation aide à assurer l'acceptabilité de cette approche, il est conseillé aux demandeurs de consulter les autorités réglementaires ou les lignes directrices appropriées au cours de l'étape de développement d'un nouvel ingrédient d'aliments pour animaux ou d'une nouvelle utilisation d'un ingrédient autorisé. Cela permettra de déterminer si cette évaluation est nécessaire.

1.2 Considérations initiales

La présente ligne directrice a été élaborée en tenant compte des pratiques actuelles d'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments pour animaux aux États-Unis d'Amérique (É.-U.), dans l'Union européenne (UE) et au Canada. Elle fait partie d'une série de lignes directrices élaborées pour faciliter l'acceptation mutuelle des données nécessaires à la détermination de l'innocuité des ingrédients d'aliments pour animaux. La coordination des exigences réglementaires pour l'évaluation des ingrédients d'aliments pour animaux vise à éliminer les tests répétitifs et inutiles sur les animaux. Les directives nationales et internationales ont été

¹ Synonymes dans d'autres contextes : salubrité, innocuité

passées en revue afin d'en tirer les meilleures pratiques. Lorsqu'il est fait référence à ces directives publiées, il convient de se reporter à leurs versions les plus récentes au moment de la réalisation du test.

L'approche proposée dans le présent document d'orientation devrait fournir une quantité suffisante de données toxicologiques pour assurer la santé des animaux et l'innocuité des aliments, tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés dans les tests et en préservant les ressources. Dans tous les cas, lorsque des tests *in vivo* sont nécessaires, le nombre d'animaux doit être justifié scientifiquement et tenir compte des principes des Trois R (remplacement, raffinement et réduction) relatifs aux tests sur les animaux. Dans certains cas, il serait approprié de combiner les tests proposés ou de les combiner avec des tests de toxicité à doses répétées.

Lors de la conception et de la réalisation des tests pertinents, le bien-être des animaux soumis aux tests doit être respecté conformément aux protocoles nationaux et internationaux. L'utilisation d'animaux dans les tests doit se conformer à ces protocoles et satisfaire aux normes éthiques générales et aux normes nationales relatives à l'utilisation et aux soins des animaux de laboratoire.

Il faut souligner qu'il peut y avoir une obligation dans certaines juridictions pour que les tests soient conduits conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Le demandeur doit être informé d'une telle exigence, le cas échéant.

1.3 Définitions

Les définitions qui suivent s'appliquent uniquement aux fins du présent document.

Substance active² : Substance entrant dans la composition d'un ingrédient d'aliments pour animaux afin de contribuer à produire l'effet escompté.

Aneugénicité³ : Capacité de causer un écart numérique du nombre modal de chromosomes dans une cellule ou dans un organisme.

Aneuploïdie³ : Écart numérique du nombre modal de chromosomes dans une cellule ou dans un organisme.

² Les microorganismes qui contribuent à produire l'effet escompté sont inclus dans cette définition.

³ Adapté du document VICH GL 23[®] (1).

Aberration chromosomique³ : Toute modification de la structure ou du nombre des chromosomes.

Clastogénéicité³ : Capacité de provoquer des changements structurels des chromosomes.

Aliment pour animaux⁴ : Tout produit composé d'un ou de plusieurs ingrédients d'aliments pour animaux, transformé, semi transformé ou brut destiné à l'alimentation directe des animaux.

Ingrédient d'aliments pour animaux⁵ : Élément constituant de toute combinaison ou de tout mélange destiné à l'alimentation animale, qu'il ait ou non une valeur nutritionnelle dans le régime alimentaire de l'animal. Les ingrédients d'aliments pour animaux peuvent être d'origine végétale, animale, microbienne ou aquatique ou être d'autres substances organiques ou inorganiques.

Mutation génique³ : Changement permanent observable à l'intérieur d'un gène unique ou perturbation dans la séquence du code génétique. Il peut s'agir de mutations ponctuelles, d'additions ou de soustractions de nucléotides.

Génotoxicité³ : Terme général désignant tout changement délétère apporté au matériel génétique, sans égard aux mécanismes qui peuvent en être responsables.

Micronoyau³ : Particule d'une cellule observable au microscope et qui contient de l'ADN nucléaire. Il peut s'agir d'un ou de plusieurs chromosomes entiers ou d'une ou plusieurs portions centriques ou acentriques d'un ou de plusieurs chromosomes. Le micronoyau est habituellement défini comme un fragment dont la taille est moindre que le 1/5, mais plus grande que le 1/20 de la taille du noyau principal.

Mutagénéicité³ : Capacité de causer un changement permanent ou héréditaire dans la quantité ou la structure du matériel génétique dans un organisme ou une cellule, qui peut entraîner un changement dans les caractéristiques de l'organisme ou de la cellule. La modification peut consister en des changements dans la séquence des bases de l'acide nucléique (mutation génique), des changements structurels dans les chromosomes (clastogénéicité) ou des changements dans le nombre de chromosomes dans les cellules (aneuploïdie ou polyploïdie).

Érythrocytes normochromatiques (ENC) : Érythrocytes matures.

⁴ Définition adaptée du *Code d'usages pour une bonne alimentation animale*, Codex Alimentarius, CAC/RCP 54-2004.

⁵ Définition adaptée du *Code d'usages pour une bonne alimentation animale*, Codex Alimentarius, CAC/RCP 54-2004.

Érythrocytes polychromatiques (EPC) : Érythrocytes immatures, aussi appelés réticulocytes.

Polypléidie³ : Changements numériques de jeux complets de chromosomes.

1.4 Portée

Le présent document d'orientation traite de l'approche à adopter pour évaluer le potentiel génotoxique des ingrédients d'aliments pour animaux et décrit les tests requis pour appuyer cette approche. En fonction de chaque administration et de l'ingrédient d'aliments pour animaux, l'interprétation des résultats des tests pourrait être utilisée pour évaluer l'ingrédient d'aliments pour animaux quant à son innocuité pour le consommateur de l'aliment d'origine animale et les travailleurs exposés à l'ingrédient d'aliments pour animaux lors de sa manipulation. Elle pourrait également être utilisée pour l'évaluation de la sécurité sanitaire pour l'animal cible.

Les tests visant à évaluer le potentiel de génotoxicité d'un ingrédient d'aliments pour animaux sont à envisager pour les substances actives purifiées ou normalisées, à l'exception des microorganismes viables.

2. PRINCIPES GÉNÉRAUX

Les tests de génotoxicité sont conçus pour détecter les ingrédients d'aliments pour animaux qui sont susceptibles d'induire des lésions génétiques par l'intermédiaire de divers mécanismes. Ces tests doivent permettre d'identifier quel danger posent les lésions causées à l'ADN et dans quelle mesure elles sont fixées, c'est-à-dire permanentes, y compris sous forme de mutations géniques, de lésions chromosomiques structurelles et numériques, ou de recombinaison, qui sont généralement considérées comme essentielles pour que les effets soient héréditaires. Ces effets peuvent jouer un rôle dans le processus complexe à plusieurs étapes de la cancérogénicité.

Les changements dans le nombre de chromosomes ont aussi été associés à la tumorigenèse et peuvent indiquer une possibilité d'aneuploïdie dans les cellules germinales.

En outre, les résultats des tests de génotoxicité peuvent être utiles pour l'interprétation des tests de cancérogénicité.

Les tests de génotoxicité des ingrédients d'aliments pour animaux sont généralement réalisés selon une approche par étapes, comme indiqué dans les [ANNEXES I](#) et [II](#) :

- Un dépistage initial fondé sur des modèles de relation structure-activité quantitative (RSAQ) par lecture croisée et par analyse *in silico*;
- Une évaluation *in vitro* pour déterminer toute activité génotoxique intrinsèque;
- En cas de résultat positif ou douteux lors de l'étape *in vitro*, une évaluation *in vivo* est effectuée pour déterminer si une telle activité s'exprime chez l'animal.

Lorsque des tests sont établis, il est recommandé de se conformer aux lignes directrices reconnues à l'échelle internationale, comme celles de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE).

Une approche fondée sur le poids de la preuve est recommandée pour évaluer et interpréter les données sur la génotoxicité. Cette approche doit tenir compte de la qualité et de la fiabilité des données sur la génotoxicité proprement dite et de toutes les informations et données pertinentes, notamment :

- Les caractéristiques physicochimiques de l'ingrédient d'aliments pour animaux;
- La réactivité chimique de la substance active, qui pourrait prédisposer à des effets au site de premier contact dans le tractus gastro-intestinal des animaux;
- Les relations structure-activité (y compris les structures indicatrices de génotoxicité et la « lecture croisée », à partir de substances de structure apparentée);
- La biodisponibilité, la toxicocinétique et le métabolisme, la spécificité de tout organe cible;
- Les résultats de tout test de toxicité et de cancérogénicité à doses répétées.

Les conclusions à tirer des résultats du test sont indicatives du potentiel génotoxique ou non de l'ingrédient d'aliments pour animaux.

3. TESTS *IN VITRO*

Les tests *in vitro* sont couramment utilisés comme étape initiale pour l'évaluation du potentiel génotoxique des ingrédients d'aliments pour animaux. Les tests *in vitro* visent à évaluer les différents paramètres des effets génotoxiques :

- Mutation génique

- Aberration chromosomique numérique
- Aberration chromosomique structurale

Les tests *in vitro* recommandés sont les suivants :

- Essai de mutation réverse sur des bactéries (Essai d'Ames) (ligne directrice n° 471 de l'OCDE);
- Essai *in vitro* sur les micronoyaux des cellules de mammifères (MNT *in vitro* – ligne directrice n° 487 de l'OCDE);
- Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères (CAT *in vitro* – ligne directrice n° 473 de l'OCDE).

Il est recommandé de combiner les tests pour satisfaire aux exigences de base afin de couvrir les trois (3) paramètres génétiques susmentionnés. Le recours à d'autres tests devrait être clairement justifié. Les trois (3) tests proposés fournissent des renseignements sur différents paramètres. L'Essai d'Ames fournit des renseignements sur la mutation génique et l'essai CAT *in vitro* permet de déceler les changements chromosomiques structurels, tandis que l'épreuve MNT *in vitro* révèle les aberrations chromosomiques structurales et numériques.

Les trois (3) tests *in vitro* sont décrits ci-dessous.

3.1 Essai de mutation réverse sur des bactéries (Essai d'Ames)

Il est recommandé de réaliser un essai de mutation réverse sur des bactéries (Essai d'Ames) conformément au protocole énoncé dans la ligne directrice n° 471 de l'OCDE (2).

L'épreuve d'Ames utilise des souches de *Salmonella typhimurium* et/ou d'*Escherichia coli* nécessitant des acides aminés pour détecter les mutations ponctuelles par substitutions de bases ou modifications du cadre de lecture dans le génome.

Le principe de cet essai est qu'elle détecte les mutations qui inversent les mutations présentes dans les souches soumises à l'essai et rétablissent la capacité fonctionnelle de la bactérie à synthétiser un acide aminé essentiel. Au moins quatre souches différentes de *S. typhimurium* doivent être utilisées. Une cinquième souche doit être soumise à l'essai, soit une cinquième souche de *S. typhimurium*, soit une souche d'*E. coli*.

3.2 Essai *in vitro* sur les micronoyaux des cellules de mammifères (MNT *in vitro*)

Il est recommandé de réaliser un essai *in vitro* sur les micronoyaux des cellules de mammifères (MNT *in vitro*) conformément au protocole énoncé dans la ligne directrice n° 487 de l'OCDE (5).

L'essai MNT *in vitro* est utilisé pour la détection des micronoyaux dans le cytoplasme des cellules en interphase. Les micronoyaux peuvent provenir de fragments de chromosomes acentriques (c'est-à-dire dépourvus de centromère) ou de chromosomes entiers incapables de migrer vers les pôles au cours de l'anaphase de la division cellulaire. Par conséquent, l'essai détecte l'activité des ingrédients d'aliments pour animaux qui peuvent être clastogènes et aneugènes, provoquant des aberrations chromosomiques structurales et numériques dans les cellules qui ont subi une division cellulaire pendant ou après l'exposition à l'ingrédient d'aliments pour animaux.

Lorsque l'essai MNT *in vitro* est positif, il peut être couplé à une hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ou à la coloration par immunofluorescence des micronoyaux à l'aide d'anticorps antikinetochores (CREST), afin de caractériser le contenu des micronoyaux et de fournir des renseignements supplémentaires sur le mode d'action prévalent (clastogénicité et/ou aneugénicité).

3.3 Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères (CAT *in vitro*)

Il est recommandé de réaliser un essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères (CAT *in vitro*) conformément au protocole énoncé dans la ligne directrice n° 473 de l'OCDE (3).

L'essai CAT *in vitro* sert à déterminer les agents qui provoquent des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules somatiques de mammifères mises en culture. Les aberrations structurales peuvent être de deux types : chromosomiques ou chromatidiennes. Cet essai ne couvre pas le paramètre d'aneuploïdie et doit donc être utilisé en combinaison avec l'un ou les deux autres essais, décrits précédemment. L'essai CAT *in vitro* a été largement utilisé pour

certains types d'ingrédients d'aliments pour animaux (p. ex., les préparations enzymatiques) (15).

3.4 Modification des tests

Dans certains cas, les demandeurs peuvent utiliser d'autres tests que ceux décrits ci-dessus, ou ils peuvent devoir modifier les protocoles des différents tests, lorsque cela est justifié scientifiquement. Par exemple, les propriétés physicochimiques d'un ingrédient d'aliments pour animaux (p. ex., volatilité, pH, solubilité, stabilité) peuvent parfois faire en sorte que les conditions normales d'essai ne conviennent pas, p. ex., aucune exposition à l'ingrédient d'aliments pour animaux à tester. Il est essentiel d'en tenir compte avant de réaliser les tests. Des protocoles modifiés doivent être utilisés lorsqu'il est évident que les conditions normales donneront des résultats faussement négatifs. Les lignes directrices adoptées par l'OCDE relativement aux tests de génotoxicité des produits chimiques donnent des indications sur la sensibilité des différents tests aux caractéristiques physiques du matériel à tester, et elles offrent des conseils concernant les mesures de compensation qui pourraient être prises. Le recours à d'autres batteries de tests de génotoxicité pour évaluer les ingrédients d'aliments pour animaux ou la modification des conditions des tests seront envisagés au cas par cas.

3.5 Interprétation des tests *in vitro*

Si tous les paramètres *in vitro* sont nettement négatifs dans des tests réalisés de manière adéquate, on peut conclure avec une certitude raisonnable que l'ingrédient d'aliments pour animaux n'est pas génotoxique.

Toutefois, la documentation publiée indique qu'un nombre limité de substances qui sont négatives dans les tests *in vitro* pourraient présenter des résultats positifs dans les tests *in vivo*. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le système d'activation métabolique *in vitro* ne couvre pas le spectre complet des éventuels métabolites génotoxiques générés *in vivo* ou par la présence de conditions particulières telles que des réactions dans le tractus gastro-intestinal. Par conséquent, la décision de procéder ou non à des tests *in vivo* après des tests *in vitro* négatifs doit tenir compte de l'approche fondée sur le poids de la preuve documentée, au cas par cas.

Si des résultats positifs sont observés dans un ou plusieurs tests *in vitro*, l'ingrédient d'aliments pour animaux doit être soumis au(x) test(s) *in vivo* pertinent(s), comme décrit à la section [Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#)

Dans le cas où les tests *in vitro* donnent un ou plusieurs résultats douteux ou non concluants, d'autres tests *in vitro* peuvent être effectués, soit en répétant le test dont les résultats sont douteux ou non concluants, en utilisant des conditions différentes, soit en réalisant un autre type de test *in vitro*.

4. TESTS *IN VIVO*

Le choix du test *in vivo* dépendra des résultats obtenus dans le test *in vitro* (c.-à-d., le ou les paramètres pertinents), compte tenu des autres renseignements disponibles.

Les tests *in vivo* recommandés sont les suivants :

- L'essai de mutations génétiques des cellules somatiques et germinales de rongeurs transgéniques (RTG, ligne directrice n° 488 de l'OCDE);
- Le test des comètes *in vivo* en conditions alcalines sur cellules de mammifères (test des comètes, ligne directrice n° 489 de l'OCDE);
- Le test *in vivo* de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères (MNviv, ligne directrice n° 474 de l'OCDE).

Le test de synthèse non programmé de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (*unscheduled DNA synthesis* (UDS)) n'est pas recommandé comme test de suivi *in vivo* des résultats positifs des tests *in vitro* de mutations géniques, comme indiqué dans l'avis de 2017 de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) (12).

Les trois (3) tests *in vivo* sont décrits ci-dessous.

4.1 Essai de mutations génétiques des cellules somatiques et germinales de rongeurs transgéniques (RTG)

Il est recommandé de réaliser un essai *in vivo* de mutations génétiques des cellules somatiques et germinales de rongeurs transgéniques (RTG) conformément au protocole énoncé dans la ligne directrice n° 488 de l'OCDE (6).

L'essai de mutations chez les rongeurs transgéniques (RTG) peut être utilisé comme essai de suivi d'un essai de mutation réverse sur des bactéries positif, soit seul, lorsque le résultat de l'épreuve MNT *in vitro* est négatif, soit en combinaison avec le test MNviv, dans le cas où le résultat de l'épreuve MNT *in vitro* est positif.

L'essai est réalisé sur des rats et des souris transgéniques qui comportent de multiples copies de vecteurs navettes de plasmides ou de phages intégrés dans leurs chromosomes et contenant des gènes rapporteurs. Il permet de détecter les mutations et les réarrangements chromosomiques (modèle plasmidique et essai Spi) induits *in vivo* par l'ingrédient d'aliments pour animaux à tester. L'essai de mutations chez les RTG permet de mesurer les mutations induites dans des *gènes marqueurs génétiquement neutres* (c.-à-d., des gènes qui n'ont pas de conséquence immédiate pour l'animal), présents dans la quasi-totalité des tissus du rongeur. On compte les mutations qui se produisent chez un rongeur en récupérant le transgène et en analysant le phénotype du gène rapporteur chez un hôte bactérien démuné du gène rapporteur.

On peut également utiliser le test pig-a, qui permet de déceler les mutations géniques *in vivo* (9, 10).

4.2 Test des comètes *in vivo* en conditions alcalines sur cellules de mammifères (test des comètes)

Il est recommandé de réaliser le test des comètes *in vivo* en conditions alcalines sur cellules de mammifères conformément au protocole énoncé dans la ligne directrice n° 489 de l'OCDE (7).

Le test des comètes peut être utilisé comme test de suivi pour vérifier la pertinence des tests *in vitro* positifs (mutagènes et clastogènes, mais pas aneugènes). Il peut donc être utilisé comme test de suivi d'un essai de mutation réverse sur des bactéries ou d'un essai de détection des aberrations chromosomiques structurales ayant donné un résultat positif, soit seul, lorsque le résultat de l'épreuve MNT *in vitro* est négatif, soit en combinaison avec le test MNviv, dans le cas où le résultat de l'épreuve MNT *in vitro* est positif.

Le test des comètes sert à déterminer les ingrédients d'aliments pour animaux qui causent des lésions à l'ADN. Il permet de détecter les cassures de brins simples et doubles de l'ADN, les lésions alcali-labiles, ainsi que les cassures de brins d'ADN survenant lors de la réparation des lésions de l'ADN. Il présente l'avantage d'être rapide, et il peut être appliqué à n'importe quel tissu d'animaux, généralement des rongeurs à partir desquels des suspensions de cellules isolées peuvent être préparées. En plus du foie, pour les substances administrées par voie orale, il serait approprié d'examiner les effets au site de contact direct, p. ex., l'estomac glandulaire ou le duodénum et jéjunum. La division cellulaire n'est pas requise, et un faible nombre de cellules

suffit pour l'analyse. Ce test est considéré comme un test indicateur détectant les lésions pré-mutagènes, et il peut être utilisé pour des tests mécanistiques.

Le test des comètes peut également être réalisé à l'aide d'enzymes de réparation de l'ADN, comme l'ADN glycosylase formamidopyrimidine (FPG), en vue de détecter les lésions des bases de l'ADN en plus des cassures des brins d'ADN.

4.3 Test *in vivo* de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères (MNviv)

Il est recommandé de réaliser le test *in vivo* de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères (MNviv) conformément au protocole énoncé dans la ligne directrice n° 474 de l'OCDE (4).

Le test MNviv peut être utilisé comme test de suivi d'une épreuve MNT *in vitro* dont le résultat est positif et en combinaison avec le test des comètes, selon un protocole normalisé, ou avec l'essai de mutations chez les RTG, lorsque l'essai de mutation réverse sur des bactéries donne également un résultat positif.

Le test MNviv sert à identifier les ingrédients d'aliments pour animaux qui provoquent des lésions chromosomiques structurales et numériques dans les cellules somatiques *in vivo*. Les lésions se traduisent par la formation de micronoyaux contenant des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers dans les jeunes érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse ou dans les réticulocytes des cellules du sang périphérique des animaux.

Ce test est utilisé depuis longtemps, et il demeure à ce jour le test de génotoxicité *in vivo* le plus utilisé pour détecter à la fois les clastogènes et les aneugènes. Le test MNviv peut être combiné avec la coloration FISH pour fournir des renseignements mécanistiques supplémentaires lorsque les résultats sont positifs.

4.4 Stratégie de sélection des tests *in vivo*

Tout test *in vivo* doit être sélectionné au cas par cas, en tenant compte de l'ensemble des données disponibles concernant l'ingrédient d'aliments pour animaux. Les tests *in vivo* doivent porter sur le ou les paramètres génotoxiques déterminés lors des tests *in vitro* et sur les organes et tissus cibles appropriés.

L'essai de mutations chez les RTG et le test des comètes sont tous deux appropriés pour le suivi des résultats positifs *in vitro* relatifs aux mutations génétiques. Il convient toutefois de noter

que l'essai de mutations chez les RTG est un essai qui mesure directement les mutations génétiques, alors que le test des comètes est un test indicateur de lésions de l'ADN qui peuvent ou non entraîner des mutations.

Le test des comètes est approprié pour le suivi des résultats positifs *in vitro* relatifs à la clastogénicité.

Le test MNviv est approprié pour le suivi des résultats positifs *in vitro* relatifs à la clastogénicité et à l'aneugénicité. Les effets au site de contact dans les tissus appropriés peuvent être envisagés pour les ingrédients d'aliments pour animaux et les métabolites hautement réactifs.

Certains scénarios typiques et approches possibles (avec différentes combinaisons de résultats positifs *in vitro*) sont décrits ci-dessous et à l'[ANNEXE II](#). Ces **exemples** sont fournis à titre indicatif et il est possible que d'autres approches soient appropriées.

- i. Essai de mutation réverse sur des bactéries **positive** et essais MNT *in vitro* / CAT *in vitro* **négatifs**

L'approche consisterait à effectuer un essai de mutations chez les RTG ou un test des comètes. Ces deux tests sont également appropriés pour la détection des effets au premier site de contact. Les tissus cibles adéquats, en particulier le site de contact et le foie, sont sélectionnés en fonction de la réactivité de l'ingrédient d'aliments pour animaux ou de son métabolite avec l'ADN (qui pourrait prédisposer à des effets au niveau du site de contact), de la biodisponibilité, du métabolisme, de la toxicocinétique et de toute spécificité de l'organe cible (si elle est connue par des études de toxicité à doses répétées).

- ii. Essai de mutation réverse sur des bactéries **négative** et essais MNT *in vitro* / CAT *in vitro* **positifs**

La sélection des études de suivi *in vivo* appropriées doit tenir compte du mode d'action correspondant pour l'induction de micronoyaux (p. ex., discrimination entre les effets clastogènes et aneugènes avec l'utilisation des technologies CREST ou FISH) et des données sur une éventuelle intervention de métabolites génotoxiques (p. ex., si les tests sont positifs uniquement en présence du mélange S9 du foie de rat). Trois (3) situations différentes peuvent être envisagées :

- a. Pour assurer le suivi approprié d'un effet aneugène *in vitro* (c.-à-d., une augmentation des noyaux positifs au centromère), il faudra effectuer un test MNviv (dans la moelle osseuse ou le sang périphérique). Si un test MNviv est réalisé de manière adéquate (avec des preuves d'une exposition importante du tissu cible) et qu'il se révèle négatif, on peut conclure que l'ingrédient d'aliments pour animaux n'est pas aneugène *in vivo*.
 - b. Pour assurer le suivi approprié d'un effet clastogène *in vitro* (c.-à-d., une augmentation des micronoyaux négatifs au centromère), détecté en l'absence de mélange S9 de foie de rat, il faudra effectuer un test MNviv (dans la moelle osseuse ou le sang périphérique) et un test des comètes dans les tissus appropriés (y compris le site de contact). Si un test MNviv et un test des comètes sont réalisés de manière adéquate (avec des preuves d'une exposition importante du tissu cible) et qu'ils se révèlent négatifs, on peut conclure que l'ingrédient d'aliments pour animaux n'est pas un clastogène *in vivo*.
 - c. Pour assurer le suivi approprié d'un effet clastogène *in vitro* détecté en présence d'un mélange S9 de foie de rat, il convient d'envisager l'intervention de métabolites clastogènes spécifiques du foie, ce qui est réalisé par une étude unique sur les rongeurs combinant un test MNviv (dans la moelle osseuse ou le sang) et un test des comètes dans le foie. Si une étude combinant le test MNviv et le test des comètes est menée de manière adéquate (avec des preuves d'une exposition importantes des tissus cibles) et qu'elle se révèle négative, on peut conclure que l'ingrédient d'aliments pour animaux ou ses métabolites ne sont pas clastogènes *in vivo*.
- iii. Essai de mutation réverse avec des bactéries et essais MNT *in vitro* / CAT *in vitro* **positifs**

Si les ingrédients d'aliments pour animaux présentent des résultats positifs dans les deux tests *in vitro*, le suivi approprié serait de combiner le test MNviv et le test des comètes avec une sélection adéquate des tissus cibles (voir ci-dessus). Si les résultats sont négatifs, on peut conclure que l'ingrédient d'aliments pour animaux n'est pas génotoxique *in vivo*. Une autre option serait de combiner un essai de mutations chez les RTG et un test MNviv.

4.5 Interprétation des tests *in vivo*

Si tous les paramètres des tests *in vivo* sont nettement négatifs, on peut en conclure que l'ingrédient d'aliments pour animaux n'est pas génotoxique.

Certaines autorités réglementaires peuvent exiger de fournir la démonstration de l'exposition des tissus cibles pour les tests *in vivo* qui donnent des résultats négatifs, afin de s'assurer que le résultat négatif n'est pas un faux négatif.

Dans ces cas, les approches possibles pour démontrer l'exposition *in vivo* pourraient comprendre les mesures suivantes :

- i. Pour les tests cytogénétiques, obtenir une réduction significative de la proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes dans le test MNviv, c'est-à-dire une diminution du rapport Érythrocytes polychromatiques (EPC) / (Érythrocytes normochromatiques (ENC) + EPC) dans la moelle osseuse ou le sang périphérique.
- ii. Démontrer que l'ingrédient d'aliments pour animaux et/ou son ou ses métabolites sont détectés de manière systémique par une méthode d'analyse valide dans un échantillon de sang spécifique prélevé au(x) moment(s) approprié(s), comme indiqué dans les lignes directrices de l'OCDE.
- iii. Procéder à la mesure directe de l'ingrédient d'aliments pour animaux et/ou de ses métabolites dans les tissus cibles.

Si des résultats positifs sont observés dans un ou plusieurs tests *in vivo*, on en conclut que l'ingrédient d'aliments pour animaux présente un potentiel génotoxique.

Un nombre croissant de données probantes indiquent que les perturbations liées aux composés touchant la physiologie des rongeurs utilisés dans les tests de génotoxicité *in vivo* peuvent entraîner des augmentations des cellules micronucléées dans la moelle osseuse qui ne sont pas liées à la génotoxicité intrinsèque des ingrédients d'aliments pour animaux testés (16). Par conséquent, l'évaluation des risques des ingrédients d'aliments pour animaux doit être effectuée au cas par cas.

Dans le cas où un ou plusieurs résultats des tests *in vivo* sont douteux ou non concluants, d'autres tests *in vivo* peuvent être réalisés.

5. ÉVALUATION DES DONNÉES ET ANALYSE STATISTIQUE

L'évaluation des données et l'analyse statistique sont décrites en détail dans les documents d'orientation technique de l'OCDE pour chacun des tests. Il est recommandé au demandeur de se reporter à ces documents d'orientation pour évaluer et analyser les données des différents tests, en tenant compte des critères d'acceptabilité propres à chaque test.

Pour le présent document d'orientation, un test est :

- Nettement positif si les conditions suivantes sont toutes réunies :
 - Un groupe de traitement présente une augmentation par rapport aux témoins négatifs concomitants, et
 - L'augmentation est liée à la dose au moins à une condition expérimentale ou à une période d'échantillonnage, et
 - Tous les résultats sont en dehors de la fourchette de distribution des données historiques des témoins négatifs.
- Nettement négatif si les conditions suivantes sont toutes réunies :
 - Aucun des groupes ne présente une augmentation par rapport aux témoins négatifs concomitants, et
 - Il n'y a pas d'augmentation liée à la dose à aucun moment de l'échantillonnage, et
 - Tous les résultats se situent dans la fourchette de distribution des données historiques des témoins négatifs.

Un test peut être considéré comme douteux ou non concluant si une seule des conditions susmentionnées est remplie. Comme le recommandent les documents d'orientation technique respectifs de l'OCDE, il convient de décider au cas par cas d'un jugement d'expert ou de procéder à des expériences de suivi.

6. RAPPORT DE DONNÉES

La présentation de rapports de données est décrite en détail dans les documents d'orientation technique de l'OCDE pour chacun des tests. Il est recommandé au demandeur de se reporter à ces documents d'orientation pour présenter les rapports de données des différents tests.

Pour récapituler, les sections suivantes doivent être incluses dans le rapport pour chaque test effectué :

- Substance active testée⁶
- Préparation de la substance active testée (*in vivo*)
- Système d'essai / Animaux soumis aux tests
- Conditions d'essai
- Résultats
- Discussion des résultats
- Conclusion

7. BIBLIOGRAPHIE

7.1 Lignes directrices internationales

1. VICH GL23[®] (Innocuité : Génotoxicité) – Études pour évaluer la sécurité des résidus des médicaments vétérinaires dans les aliments humains : test de génotoxicité
2. *Ligne directrice* n° 471 de l'OCDE : Essai de mutation réverse sur des bactéries, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques
3. *Ligne directrice* n° 473 de l'OCDE : Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques
4. *Ligne directrice* n° 474 de l'OCDE : Le test de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifère, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques
5. *OECD Guideline* n° 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals
6. *OECD Guideline* n° 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene mutation Assays, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals
7. *OECD Guideline* n° 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals
8. ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use – Step 5.
9. OECD Environment Directorate Joint Meeting of the Chemical Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Series on Testing and Assessment n° 315: The *in vivo*

⁶ Si l'ingrédient d'aliments pour animaux contient un mélange de substances actives, il est préférable de soumettre chaque substance active à un test individuel, dans la mesure du possible (12).

erythrocyte Pig-a gene mutation assay – Part 1 – Detailed Review Paper and Retrospective Performance Assessment.

10. OECD Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Series on Testing and Assessment n° 316: The *in vivo* erythrocyte Pig-a gene mutation assay – Part 2: Validation Report

7.2 Documents d'orientation européens

11. EFSA Scientific Committee. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal* 2011;9(9):2379, 69 pages.
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2011.2379> .
12. EFSA Scientific Committee. Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger M, Knutsen HK, More S, Naegeli H, Noteborn H, Ockleford C, Ricci A, Rychen G, Silano V, Solecki R, Turck D, Younes M, Aquilina G, Crebelli R, Gurtler R, Hirsch-Ernst KI, Mosesso P, Nielsen E, van Benthem J, Carfi M, Georgiadis N, Maurici D, Parra Morte J et Schlatter J, 2017. Scientific Opinion on the clarification of some aspects related to genotoxicity assessment. *EFSA Journal* 2017;15(12):5113, 25 pages.
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.5113>
13. EFSA Scientific Committee. More S, Bampidis V, Benford D, Boesten j, Bragard C, Halldorsson T, Hernandez-Jerez A, Hougaard-Bennekou S, Koutsoumanis K, Naegeli H, Nielssen SS, Schrenk D, Silano V, Turck D, Younes M, Aquilina G, Crebelli R, Gurtler R, Hirsch-Ernst KI, Mosesso P, Nielsen E, Solecki R, Carfi, M, Martino C, Maurici D, Parra Morte J et Schlatter J, 2019. Statement on the genotoxicity assessment of chemical mixtures. *EFSA Journal* 2019;17(1):5519,11 pages.
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2019.5519>

7.3 AUTRES

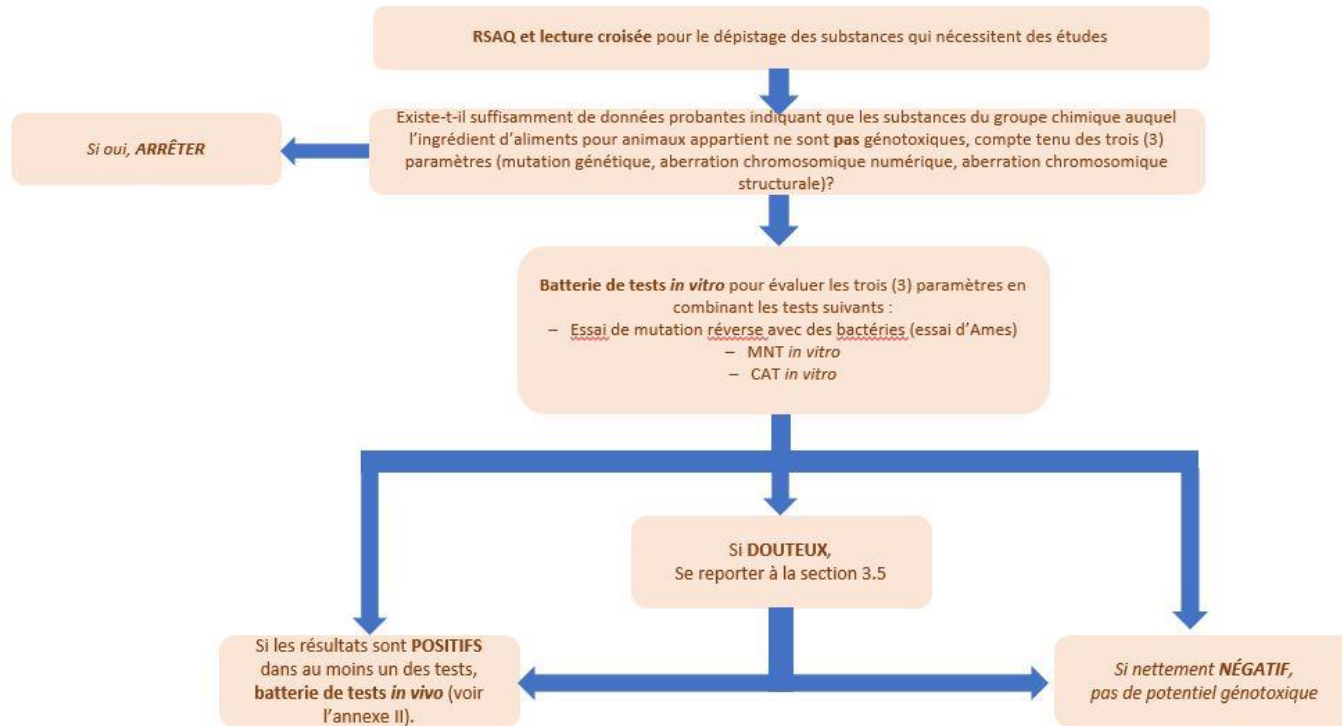
14. Code d'usages pour une bonne alimentation animale – CAC/RCP 54-2004
http://www.fao.org/input/download/standards/10080/CXP_054f.pdf
15. G.S. Ladics, V; Sewalt: Industrial microbial enzyme safety: what does the weight of evidence indicate? – *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 98(2018) 151-154
16. Tweats *et al.*: Report of the IWGT working group on strategies and interpretation on regulatory *in vivo* tests: I Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards – *Mutation Research* 627 (2007) 78-91

8. ABBRÉVIATIONS

CREST	Immunofluorescence à l'aide d'anticorps antikinetochores
ADN	Acide désoxyribonucléique
FISH	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence
BPL	Bonnes pratiques de laboratoire
MNT	Essai sur les micronoyaux des cellules de mammifères
MNviv	Test <i>in vivo</i> de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
FPG	ADN glycosylase formamidopyrimidine
RSAQ	Relation structure-activité quantitative <i>in silico</i>
RTG	Rongeurs transgéniques
UDS	Test de synthèse non programmée de l'ADN (<i>unscheduled DNA synthesis</i>)

ANNEXE I

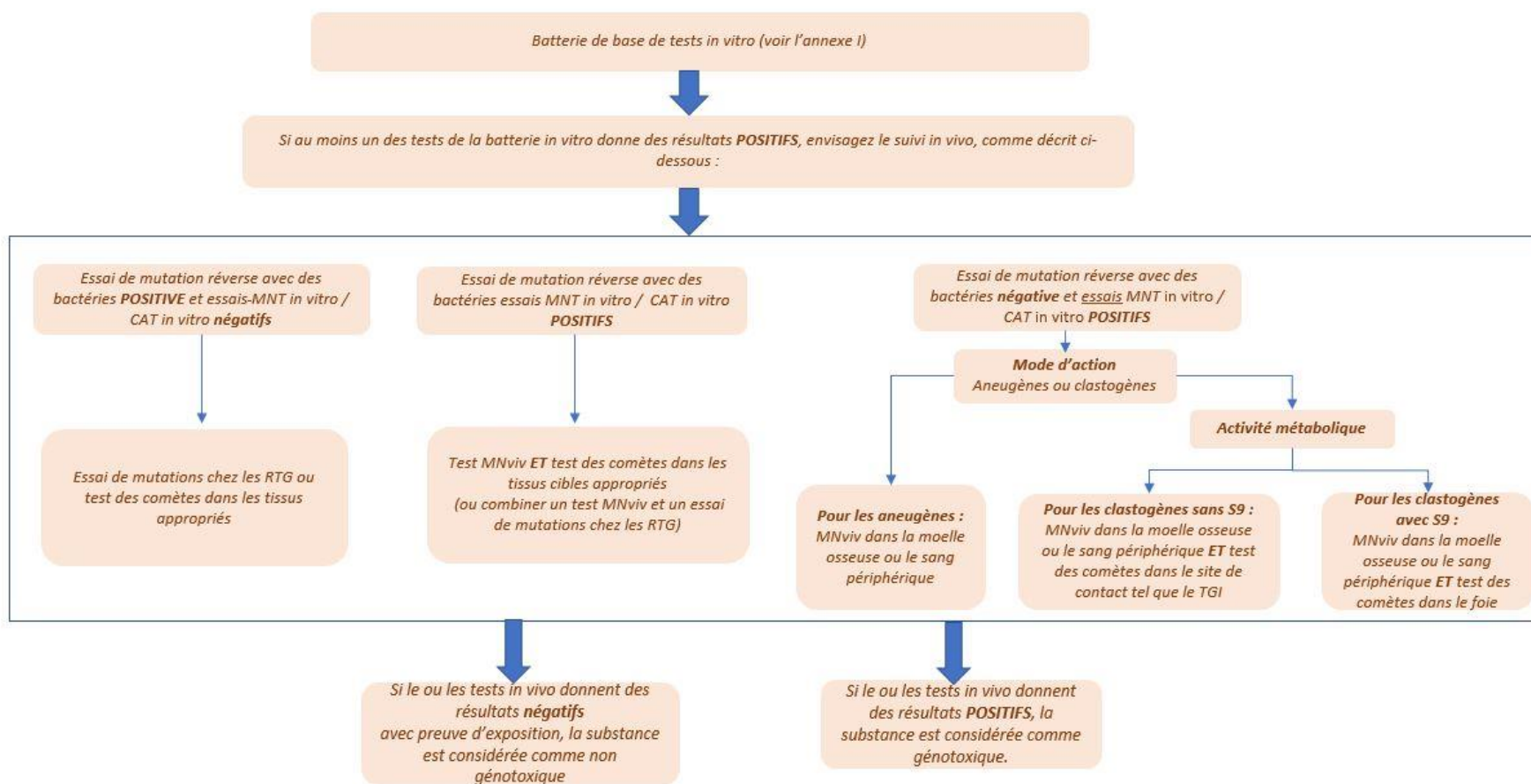
Approche par étapes pour les tests de génotoxicité *in vitro*



MNT *in vitro* = Essai *in vitro* sur les micronoyaux des cellules de mammifères
CAT *in vitro* = Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères

ANNEXE II

Stratégie pour les tests de génotoxicité in vivo



MNT *in vitro* = Essai *in vitro* sur les micronoyaux des cellules de mammifères
CAT *in vitro* = Essai d'aberration chromosomique *in vitro* chez les mammifères
MNv = Test *in vivo* de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères
RTG = Rongeurs transgéniques
TGI = Tractus gastro-intestinal